

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Abe, et al.
Serial No. : 09/989,975
Filed : November 21, 2001
Title : NUCLEIC ACIDS, EXPRESSION VECTORS AND HOST CELLS FOR
MAKING CHIMERIC NUCLEIC ACIDS AND METHODS FOR PRODUCING
IMMOBILIZED POLYPEPTIDES

Art Unit : 1632
Examiner : Unknown

U.S. Patent and Trademark Office
Arlington, VA 22202

MAY 08 2002

TECH CENTER 1600/2300

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicant hereby confirms their claim of priority under 35 USC §119 from the following applications:

- Japan Application No. 2001-190524 filed June 22, 2001
- Japan Application No. 2000-354396 filed November 21, 2000

A certified copy of each application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: April 30, 2002

Mi K. Kim
Reg. No. 44,830

Fish & Richardson P.C.
4350 La Jolla Village Drive, Suite 500
San Diego, California 92122
Telephone: (858) 678-5070
Facsimile: (858) 678-5099

10179394.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the U.S. Patent and Trademark Office, P.O. Box 2327, Arlington, VA 22202.

April 30, 2002

Date of Deposit

Signature

Lauren Bihser

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: June 22, 2001

Application Number: Japanese Patent Application
No. 2001-190524

Applicant(s): NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL
SCIENCE AND TECHNOLOGY

January 29, 2002

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (seal)

Certificate No. 2002-3002318



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 6月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-190524

[ST.10/C]:

[JP2001-190524]

出 願 人

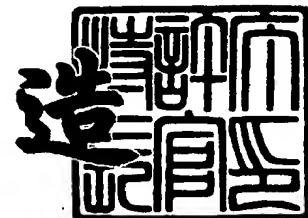
Applicant(s):

独立行政法人産業技術総合研究所

2002年 1月29日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3002318

【書類名】 特許願

【整理番号】 332-01094

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 安部 博子

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 新聞 陽一

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 地神 芳文

【特許出願人】

 【識別番号】 301021533

 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

 【代表者】 吉川 弘之

 【電話番号】 0298-61-3280

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 特願2000-354396

 【出願日】 平成12年11月21日

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 融合遺伝子発現ベクター及び固定化酵素の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) 又は (b) の酵母細胞壁タンパク質をコードする遺伝子の下流に、有用タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むことを特徴とする、融合遺伝子発現ベクター。

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ酵母細胞壁への局在及び固定化能を有するタンパク質

【請求項 2】 有用タンパク質が、糖転移酵素タンパク質である請求項 1 に記載の融合遺伝子発現ベクター。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の融合遺伝子発現ベクターにて形質転換された形質転換酵母。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を酵母細胞壁表層に発現させ、有用タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の方法により得られた固定化酵素。

【請求項 6】 固定化される酵素が糖転移酵素である請求項 5 に記載の固定化酵素

【請求項 7】 請求項 6 の固定化酵素を用いることを特徴とする糖鎖又は糖類の製造方法。

【請求項 8】 以下の (a) 又は (b) の酵母細胞壁タンパク質をコードする遺伝子の下流に、有用タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むことを特徴とする、融合遺伝子発現ベクター。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ酵母細胞壁への局在及び固定化能を有するタンパク質

【請求項 9】 有用タンパク質が、糖転移酵素タンパク質である請求項 8 に記載の融合遺伝子発現ベクター。

【請求項 10】 請求項 8 または 9 に記載の融合遺伝子発現ベクターにて形質転換された形質転換酵母。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を酵母細胞壁表層に発現させ、有用タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

【請求項 12】 請求項 11 に記載の方法により得られた固定化酵素。

【請求項 13】 固定化される酵素が糖転移酵素である請求項 12 に記載の固定化酵素。

【請求項 14】 請求項 13 に記載の固定化酵素を用いることを特徴とする糖鎖又は糖類の製造方法。

【請求項 15】 請求項 1 および 8 に記載の融合遺伝子発現ベクターを少なくとも 2 種以上含有させることにより形質転換された形質転換酵母。

【請求項 16】 請求項 15 に記載の形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を同時に酵母細胞壁表層に発現させ、少なくとも 2 種以上の有用タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

【請求項 17】 請求項 16 に記載の方法により得られた固定化酵素

【請求項 18】 固定化される酵素が 2 種以上の糖転移酵素である請求項 17 に記載の固定化酵素。

【請求項 19】 請求項 18 に記載の固定化酵素を用いることにより、糖鎖又は糖類を連続的に変換させることを特徴とする糖鎖又は糖類の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、酵母細胞壁への局在及び固定化能を有する P i r (protein internal repeat) タンパク質を所望の有用タンパク質の N-末端に結合させた融合タンパク質の形で酵母細胞壁表層に発現させるための融合遺伝子発現ベクター、及

び当該発現ベクターにて形質転換された酵母、有用タンパク質が該酵母細胞壁に固定化されている固定化酵素に関するものであり、さらに、有用タンパク質が糖転移酵素であって、上記酵母細胞壁に固定化された糖転移酵素を使用して糖鎖又は糖類を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

バイオリクター等で物質生産のために使用される酵素タンパク質は、操作の利便性や経済的観点から、一般には不溶性担体に固定化して固定化酵素として利用される。固定化酵素の製造法としては、酵素タンパク質を精製し、樹脂ビーズ等に固定化する方法が一般的である。しかし、酵素タンパク質の大量精製は操作が煩雑であるばかりでなく、コストもかかり、また精製過程で酵素活性が失活する可能性がある。さらに樹脂ビーズ等の担体に固定化する過程で酵素活性が失活する可能性もあり得る。また、酵素タンパク質を生産する細胞をそのまま固定し、固定化酵素として使用する例もあるが、この場合、酵素タンパク質は細胞内部にあり、酵素反応の効率が最適とは言えない。従って、酵素タンパク質を担体となる細胞表面に局在化させることが望ましい。

【0003】

細胞膜タンパク質の膜への結合様式のひとつとして、糖脂質である GPI (glycosylphosphatidyl-inositol) がタンパク質の C 末端に結合し、その脂質部分が膜内に埋もれてタンパク質を膜につなぎとめる形 (GPI アンカー) が存在することが知られている (Conzelmann, EMBO J. 7, 2233-2240, (1988))。この GPI アンカーを有する細胞壁タンパク質 (GPI アンカータンパク質) の細胞壁への固定化は、まずタンパク質生合成過程の小胞体においてタンパク質の C 末端部分が切断除去され、そこに GPI アンカーが付加された後、ゴルジ体において GPI コア糖鎖の修飾を受けて細胞膜まで輸送され、そこで細胞壁グルカンにタンパク質部分が転移され、細胞壁に共有結合されることによって行われることが報告されている (Lu, J. Cell, Biol. 128, 333-340, (1995))。従って、GPI アンカーは細胞表層にタンパク質を固定化する手段として有用であり、GPI により細胞壁に固定化される α -アグルチニンを利用して異種タンパク質を

細胞壁に固定化する技術も確立している (Schreuder ら、Trends Biotechnol., 14, 115-120, (1996))。しかしながら、G P I アンカーの欠点は、G P I アンカーシグナルがタンパク質のC-末端に融合した場合には細胞壁への局在化と固定に機能するが、タンパク質のC-末端に融合しなければ機能しないことである (Lipke, Mol. Cell Biol. 9, 3155-3165, (1989))。かかる欠点を回避する方法として、a-アグルチニンを構成する2つのサブユニット、A G A 1 p (Roy, Mol Cell Biol., 11, 4196-4206, (1991))とA G A 2 p (Cappellaro, EMB O J., 10, 4081-4088, (1991))の細胞表層での結合を利用するGPIアンカー型細胞表層固定化の変法が報告されている (Boder and Wittrup, Nature Biotechnol. 15, 553-557, 1997)。具体的にはG P I アンカーにより細胞壁に固定化されたA G A 1 pに、A G A 2 pのC-末端側に目的タンパク質を連結させた融合タンパク質をS-S結合を介して細胞壁上で結合させ、目的タンパク質を細胞表層に固定化しようとするものである。しかしながら、この方法はA G A 1 pを発現している細胞にしか適応できない。

【 0 0 0 4 】

一方、ヒトのホルモンや生理活性物質の多くや、これらの生理活性物質の受容体はタンパク質とそれに付加された糖鎖で構成されている。この糖鎖部分は、生理活性に重要な働きを果たし、タンパク質本体だけでは本来の機能を果たすことができない (木幡陽, 蛋白質核酸酵素, 36, 775-788 (1991))。糖転移酵素は、この糖鎖構造形成に必須な酵素であり、ヒトでは数百種類あると考えられており、微生物や植物の糖転移酵素を含めれば、その種類は膨大なものとなる。糖転移酵素は、その基質特異性が極めて高く、特定の構造の受容体糖鎖に特定の糖を特定の結合様式で付加し、特定の構造の糖鎖を合成する (Qwens, Biochem. Biophys. Res. Commun., 109, 1075-1082, (1982); Betteridge, Eur. J. Biochem., 132, 29-35, (1983))。よって、糖鎖の構造は、多種類の糖が枝分かれを含む多様な結合様式で結合した無限の構造の多様性をもっており、その構造の多様性は様々な糖転移酵素の基質特異性の組み合わせで決まる。したがって、複合糖質を生産利用する際、糖鎖構造を正確に制御しないかぎり生体内で機能する物質を製造できないため、必要な糖鎖構造を合成する糖転移酵素を効率よ

く発現し調製する必要がある。

大半の糖転移酵素はII型膜タンパク質で、C-末端側の活性領域がゴルジ体の内腔に配向したトポロジーでゴルジ体膜に局在している (Paulson, J. Biol. Chem., 264, 17615-17618, 1989)。したがって、糖転移酵素のC-末端側を遺伝子改変すると、酵素活性を損なう場合が多い。そのため、上述したようにC-末端側に結合させないと機能しないGPIアンカーでは酵素活性を保持したまま糖転移酵素を細胞壁に固定化することが極めて困難である。これに対し、糖転移酵素のN-末端側には膜貫通領域があり、この部分で膜に局在しているため、この膜貫通領域を欠失させればゴルジ体に滞留することなく、細胞表面に分泌されることが報告されている (Weinstein, J. Biol. Chem. 263, 17735-17743, (1987))。したがって、この膜貫通領域を欠失させた糖転移酵素に他の細胞表層に固定化するための新たなアンカータンパク質を付加すれば糖転移酵素の局在性を操作する上で有効と考えられる。

【0005】

Pir (protein internal repeat) タンパク質は、酵母細胞壁に共有結合している細胞壁タンパク質であり、Pir1-4までの互いにホモロジーのある遺伝子間でファミリーを形成している (TOH-E, YEAST, 9, 481-494, (1993); Mrsa, YEAST, 13, 1145-1154, (1997))。しかし、Pirタンパク質はGPIアンカー付加シグナルを持たず、さらには塩や界面活性剤では溶出せず、アルカリ条件で細胞壁から離脱することから、GPIアンカー型タンパク質とは異なる結合様式で細胞壁に局在および結合していると考えられ、またそのメカニズムについては不明である (Mrsa, YEAST, 15, 813-820, (1999))。

Pirをアンカータンパク質に使用するという試みは、Pir4タンパク質をコードする遺伝子でproteinA遺伝子を挟み込み細胞壁に局在化させる (Moukadiriら、J. Bacteriology, 181, 4741-4740, (1999)) というものであった。しかし一概にPirタンパク質といっても細胞壁に対する結合様式は一様ではなく、例えばPir4は β -メルカプトエタノール処理により細胞壁から遊離させることができるのに対し、Pir1、Pir2は β -メルカプトエタノール処理では遊離させることができずアルカリ条件下でのみ細胞壁から溶出させること

ができることから、細胞壁への結合様式が異なると考えられている (Moukadiri ら、J. Bacteriology, 181, 4741-4740, (1999))。また、P i r 4 と融合させたタンパク質が p r o t e i n A であり、酵素のようなタンパク質に比べ、さほど厳密な構造を必要としないこと、および目的タンパク質の N- 端側に融合させていないことなどから、発現されるタンパク質が、例えば酵素タンパク質のようなその活性が構造と密接に関係しているような場合においては、P i r 4 タンパク質をコードする遺伝子をアンカータンパク質として用いても、得られる発現タンパク質が酵素活性を有するとまではいえない状況であった。

【0 0 0 6】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、C- 末端を遺伝子操作することにより活性が損なわれる糖転移酵素に代表されるタンパク質を、その活性を保持したまま酵母細胞壁表層に局在及び固定化し、これを固定化酵素として提供することを目的とする。

【0 0 0 7】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、酵母細胞壁の P i r タンパク質をコードする遺伝子の下流に、有用タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含む融合遺伝子発現ベクターにて酵母を形質転換すれば、P i r タンパク質が有用タンパク質の N- 末端に結合した融合タンパク質が酵母細胞壁表層に発現し、しかも有用タンパク質の活性は維持されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0 0 0 8】

すなわち、本発明は、以下 (1) ~ (1 6) に示すとおりのものであり、これらにより上記課題が解決される。

(1) 以下の (a) 又は (b) の酵母細胞壁タンパク質をコードする遺伝子の下流に、有用タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むことを特徴とする、融合遺伝子発現ベクター。

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠

失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ酵母細胞壁への局在及び固定化能を有するタンパク質

(2) 有用タンパク質が、糖転移酵素タンパク質である(1)に記載の融合遺伝子発現ベクター。

(3) (1)または(2)に記載の融合遺伝子発現ベクターにて形質転換された形質転換酵母。

(4) (3)に記載の形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を酵母細胞壁表層に発現させ、有用タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

(5) (4)に記載の方法により得られた固定化酵素。

(6) 固定化される酵素が糖転移酵素である(5)に記載の固定化酵素

(7) (6)の固定化酵素を用いることを特徴とする糖鎖又は糖類の製造方法。

(8) 以下の(a)又は(b)の酵母細胞壁タンパク質をコードする遺伝子の下流に、有用タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むことを特徴とする、融合遺伝子発現ベクター。

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ酵母細胞壁への局在及び固定化能を有するタンパク質

(9) 有用タンパク質が、糖転移酵素タンパク質である(8)に記載の融合遺伝子発現ベクター。

(10) (8)または(9)に記載の融合遺伝子発現ベクターにて形質転換された形質転換酵母。

(11) (10)に記載の形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を酵母細胞壁表層に発現させ、有用タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

(12) (11)に記載の方法により得られた固定化酵素。

(13) 固定化される酵素が糖転移酵素である(12)に記載の固定化

酵素。 (14) (13) に記載の固定化酵素を用いることを特徴とする糖鎖又は糖類の製造方法。

(15) (1) および (8) に記載の融合遺伝子発現ベクターを少なくとも2種以上含有させることにより形質転換された形質転換酵母。

(16) (15) に記載の形質転換酵母を培養し、融合遺伝子を同時に酵母細胞壁表層に発現させ、少なくとも2種以上の有用タンパク質が細胞壁に固定化されている酵母を取得することを特徴とする、固定化酵素の製造方法。

(17) (16) に記載の方法により得られた固定化酵素

(18) 固定化される酵素が2種以上の糖転移酵素である (17) に記載の固定化酵素。

(19) (18) に記載の固定化酵素を用いることにより、糖鎖又は糖類を連続的に変換させることを特徴とする糖鎖又は糖類の製造方法。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の融合遺伝子発現ベクターは、配列番号1あるいは2のアミノ酸配列を有する酵母の細胞壁に存在する *Pir* タンパク質をコードする遺伝子の下流に所望の酵素タンパク質遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むものである。

【0010】

本発明において用いる *PIR* 遺伝子は、配列番号1で示される *Pir1* タンパク質をコードする遺伝子 (*PIR1*)、および配列番号2で示される *Pir2* タンパク質をコードする遺伝子 (*PIR2*) であり、また、これらタンパクのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ酵母細胞壁への局在及び固定化能を有するタンパク質をコードする遺伝子である。これら遺伝子は、具体的には、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の W303-1A (*ura3, leu2, his3, trp1, ade2*) [Kainumaら、*Glycobiology*, Vol. 9, 133-141 (1999)] 株から得たゲノムを鋳型にしてPCR法により取得することができる。プライマーには、*Pir* タンパク質をコードする部分を容易に切り出せるとともに、標識抗原遺伝子等を簡単に挿入できるのに便利な制限酵素切断部分を付与したものをを用いる。

【 0 0 1 1 】

また、上記 P I R 遺伝子の下流に結合させる所望の有用タンパク遺伝子としては、いかなるものでもよいが、例えば、C末端を遺伝子操作することにより活性が損なわれてしまう可能性のあるタンパク質、例えば糖転移酵素遺伝子が好適である。具体的には、ガラクトース転移酵素、フコース転移酵素、グルコース転移酵素、マンノース転移酵素、ガラクトサミン転移酵素、シアル酸転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素等を挙げることができる。

【 0 0 1 2 】

P I R 遺伝子の下流に所望のタンパク質遺伝子を結合させた融合遺伝子は、その上流にプロモーターを、下流にターミネーターを挿入して発現カセットを構築し、これを発現ベクターに導入する。あるいは、該融合遺伝子を導入する発現ベクターにプロモーターとターミネーターが既に存在する場合は、発現カセットを構築することなく、そのプロモーターとターミネーターを利用してその間に該融合遺伝子のみを導入すればよい。

【 0 0 1 3 】

発現カセット中のプロモーターは、酵母発現系で一般に使用され、形質転換酵母菌内で導入した融合遺伝子を発現させることができるプロモーターであれば特に限定はないが、例えば、PGK、GAP、TPI、GAL1、GAL10、ADH2、PHO5、CUP1等が挙げられ、特にGAPプロモーターが好ましい。

【 0 0 1 4 】

一方、ターミネーターは、酵母発現系で一般に使用され、導入した融合遺伝子の下流に存在させて転写終結が可能とするものであればよく、例えば、ADH1、TDH1、TFF、TRP5等が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

発現カセットを導入する発現ベクターとしては、酵母発現系で一般に使用され、それにて形質転換した形質転換酵母菌の細胞壁表層に融合遺伝子を発現させることのできるものであれば特に限定はないが、酵母エピソード型発現ベクターが好適に使用されうる。

【 0 0 1 6 】

酵母エピソーム型プラスミドベクター (yeast episome plasmid vector) は、酵母の本来もつ 2 μ プラスミドの配列を含んでおり、その複製起点を利用して宿主酵母細胞内で複製できるようにしたベクターである。本発明で使用する酵母エピソーム型発現ベクターは、酵母の 2 μ プラスミド配列の少なくともARS 配列を含んでおり、かつ宿主酵母菌体内において染色体外で増殖することができれば特に限定はされない。例えば、YEp51、pYES2、YEp351、YEp352等が挙げられる。

【0017】

上記の酵母エピソーム型発現ベクターは、組換え大腸菌でのサブクローニングを行なえる様、大腸菌体内部で増殖できるシャトルベクターである方が好ましく、またアンピシリン耐性遺伝子等選択マーカー遺伝子を含むものがさらに好ましい。また、該発現ベクターは、組換え酵母を作成した際に、栄養要求性や薬剤耐性によって酵母クローンを選抜できる、マーカー遺伝子を含む。マーカー遺伝子としては、例えば、HIS3、TRP1、LEU2、URA3、ADE2、CAN1、SUC2、LYS2、CUP1等が挙げられる（大島泰治編著、生物化学実験法39、酵母分子遺伝学実験法、119-144（1996））。これらはあくまで例示であり、遺伝子導入の宿主とする酵母菌株の遺伝子型に応じて選択されるべきものである。

【0018】

上述した融合遺伝子発現プラスミドの構築に関する一連の手法は、後記実施例の記載を参照して、あるいは慣用の技術により当業者が適宜実施することができる。

本発明において、上記の融合遺伝子発現ベクターにて形質転換させる宿主酵母としては、サッカロマイセス属、カンジダ属に属する酵母を用いるが、特に限定はされない。サッカロマイセス属の酵母としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* KK4株、Y334株、Inv-Sc1株、W303株等が挙げられる。

【0019】

融合遺伝子発現ベクターにて酵母を形質転換するには、例えば、リチウム酢酸法、エレクトロポレーション法等の公知の方法を利用できる（Becker and Guarente, *Methods Enzymol.*, 194, 182-187（1991））。

また、本発明においては、同種のPIR遺伝子に異なる有用タンパク質をコー

ドする遺伝子を結合せしめた複数の発現ベクターを用いて酵母を同時に形質転換してもよく、また異種のPIR遺伝子（例えばPIR1遺伝子とPIR2遺伝子）を用い、これらに各々異なる有用タンパク質をコードする遺伝子を結合せしめた複数の発現ベクターにより酵母を同時に形質転換してもよい。これらの場合においては、例えば、有用タンパクをコードする遺伝子として、関連する各々異なる糖転移酵素タンパク質をコードする遺伝子を複数用いれば、形質転換された酵母からなる固定化酵素は、複数の反応を連続して行うことができ、極めて多様な糖鎖又は糖類を製造し得るという利点がある。

【0020】

形質転換酵母のスクリーニングのために、適当な選択マーカーを用いる。一例として、宿主細胞の染色体DNA上の代謝に関与する遺伝子を用いることが望ましい。すなわち、染色体DNA上の上記遺伝子を突然変異等の適当な手段により機能しないような宿主細胞を用い、相当する正常な遺伝子を含む発現ベクターを形質転換することにより、正常な代謝遺伝子を含む形質転換細胞のみを増殖させてスクリーニングできる物が好ましい。具体的には上記したようなURA3、LEU2等広く用いられている選択マーカー遺伝子を発現ベクターに接続する。染色体組み込み型タイプ（YIpタイプ）の場合にもこれらの遺伝子はスクリーニングのマーカーとなる。

【0021】

形質転換された形質転換酵母を培養すると、Pirタンパク質が所望のタンパク質のN末端に結合した融合タンパク質を該細胞の細胞壁表層に発現させることができる。所望のタンパク質は、Pirを介して形質転換酵母の細胞壁表層に固定化されているので、当該形質転換酵母はそのまま固定化酵素として利用できる。

形質転換酵母の培養方法は、酵母の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

培地としては、酵母が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地を用いる。例えば、Difco社から供給される各種の培地成分を添加し、かつプラスミドの複製・保持に必要なマーカーによって

供給可能となるアミノ酸を除いた合成培地（炭素源、窒素源、無機塩類、アミノ酸、ビタミン等を含む）等を利用できる（Sherman, Methods Enzymol., 194, 3-57 (1991)）。

【0022】

培地のpHは、6～8に調節することが適当である。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

培養は、28～32℃、好ましくは30℃で、15～48時間、通気や攪拌を加えて行う。

【0023】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】 （出芽酵母PIR1遺伝子のクローニング）

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のW303-1A (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら、Glycobiology, Vol. 9, 133 (1999)] 株から得たゲノムを鋳型にしてPCR法によりPIR1遺伝子の単離を行った。

プライマーはデータベース上に登録されている塩基配列 (DB名: GenBank; アクセス: D13740) に基づいて設計した。その際に、タンパク質をコードしている部分が制限酵素を用いて容易に切り出せるとともに、標識抗原遺伝子等が簡単に挿入できるように、N-末端部分にSacI部位、C-末端部分にNotI部位をあらかじめ含んだプライマーを設計した。それぞれのプライマーの塩基配列を以下に示す。

【0024】

フォワードプライマー:

5'-GGGGGGAGCTCATGCAATACAAAAATCATTAGTTGCCTCCGCC-3'

(配列番号3)

リバースプライマー:

5'-CCCCCGCGGCCGACAGTGCAAATCGATAGC

(配列番号4)

ここでフォワードプライマーの塩基配列中の下線部分はSacI部位を示し、リバープライマーの塩基配列中の下線部分はNotI部位を示す。このようにして設計したプライマーは常法により合成した。

PCR溶液の組成は以下の表1に示す。

【0025】

【表1】

PCR 溶液の組成	
10 × ExpandHF バッファー (15mM MgCl ₂ を含む)	10 μ l
dNTP Mixture (各 2.5mM)	8 μ l
フォワードプライマー (20pmol/ μ l)	2 μ l
リバープライマー (20pmol/ μ l)	2 μ l
ゲノム DNA	3 μ l
Expand TM High Fidelity PCRSystem 酵素ミックス	0.75 μ l
水	74.25 μ l
合計	100 μ l

【0026】

また、PCRの温度条件は、94℃で2分鋳型DNAを変性した後、94℃で15秒（変性）、50℃で30秒（アニーリング）、72℃で1分（伸長）の反応を1サイクルとし、これを10サイクル行う。次に94℃で15秒（変性）、50℃で30秒（アニーリング）、72℃で1分（伸長）に加えてサイクル当たり5秒間の延長を伴う反応を1サイクルとし、これを15サイクル行う。最後に72℃で7分間伸長する。このPCRによって得られた約1kbpのDNA増幅断片をNotI-SacIで切りだし、pBluescript II SK(-) (stratagen 社) のNotI-SacI部位に挿入してpBSII(PIR1) (pAB2) を構築した。

【0027】

【実施例2】 (分裂酵母HA-gma12融合遺伝子の構築)

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) のgma12遺伝子 (DB名: GenBank; アクセス番号: Z30917) (Chappell, Mol. Biol. Cell, 5, 519-528 (1994)) もまたPCRを用いてクローニングした。PCR溶液の組成は表2に示す。

【0028】

【表 2】

PCR 溶液の組成

10 × ExpandHF バッファー (15mM MgCl ₂ を含む)	10 μ l
dNTP Mixture (各 2.5mM)	8 μ l
フォワードプライマー (20pmol/ μ l)	2 μ l
リバースプライマー (20pmol/ μ l)	2 μ l
プラスミド DNA	1 μ l
Expand TM High Fidelity PCRSys ^{tem} 酵素ミックス	0.75 μ l
水	76.25 μ l
合計	100 μ l

【 0 0 2 9 】

YEpU-GAP-gma12 (YOKO-0ら、Eur.J. Biochem., 257, 630-637, (1998)) を鋳型に用い、プライマーはGma12タンパク質のN-末端側にある膜貫通領域を除いて増幅できるように設計し、増幅産物のN-末端側にSalI、C-末端側にXhoI部位をあらかじめ含むようにした。以下の塩基配列を有するプライマーを用いた。

【 0 0 3 0 】

フォワードプライマー：

5'-GGGGGGTCGACAGCCCCGATACCAAGCTTCAAACGAAGATG

(配列番号5)

リバースプライマー：

5'-GGGGCTCGAGCTAGGATGATGGTTTCAAAAGATTTTGAATATGATCC

(配列番号6)

ここで、フォワードプライマーの塩基配列中の下線部はSalI部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はXhoI部位を示す。またPCRの温度条件は、PIR1をPCRにて増幅した際に用いた条件と同じ条件で行った。

【 0 0 3 1 】

次いで、gma12遺伝子をpBluescript II SK(-) (stratagen 社) のSalI-XhoI部位に挿入し、さらにインフレームになるように3×HA標識抗原遺伝子をNotI-SalI部位に挿入してpBSII(HA-gma12) (pAB1)を構築した。

【 0 0 3 2 】

【実施例 3】 (PIR1-HA-gma12融合遺伝子の作製及び融合遺伝子発現ベクター

の作製、並びにこのプラスミドを含む酵母形質転換体の作製)

pBSII(PIR1)に挿入されているPIR1遺伝子をSacI-NotIで切りだし、pBSII(HA-gma12)のSacI-NotI部位に挿入し、pBSII(PIR1-HA-gma12) (pAB3) を構築した。

このpBSII(PIR1-HA-gma12)からPIR1-HA-gma12融合遺伝子のC-末端側にSmaI部位を付加するため以下の塩基配列を有するプライマーを用いてPCR法により遺伝子を増幅した。

【 0 0 3 3 】

フォワードプライマー：

5'-GGGGGGAGCTCATGC AATACAAAAATCATTAGTTGCCTCCGCC-3'

(配列番号3)

リバースプライマー：

5'-GGGGCCCGGGCTAGGATGATGGTTTCAAAGATTTTGAATATGATCC-3'

(配列番号7)

ここで、フォワードプライマーの塩基配列中の下線部はSacI部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はSmaI部位を示す。

【 0 0 3 4 】

この増幅産物をSacI-SmaIで切り出した後、酵母の発現ベクターYEp352GAP [Royら、J. Biol. Chem. , Vol. 237, 2538-2590 (1998)] のマルチクローニング部位をpUC18のマルチクローニング部位のうちのEcoRIからSalIまでの部分でさしかえた発現用ベクターYEp352GAP-II (当研究室の仲山より供与) のSacI-SmaI部位に挿入してYEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) (pAB4) を構築した (図1) 。

【 0 0 3 5 】

発現ベクター YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) は酵母W303-1A株 (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら、Glycobiology, 9, 133-141 (1999)] に形質転換し、W303- YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) 株を得た。

なお、W303- YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) 株は、平成12年11月16日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P- 18125として寄託されている。

【 0 0 3 6 】

【実施例4】 (Pir1-HA-Gma12融合タンパク質の酵母細胞内での発現)

実施例 3 で得られた形質転換体について、細胞内で融合遺伝子が発現し、融合タンパク質が酵母細胞表層に提示されているかどうかを間接蛍光抗体法にて調べた。

まず、上記形質転換体 W303-YEp352GAP-II (PIR1-HA-gma12) 株とコントロールとして YEp352GAP-II を W303-1A 株に形質転換した W303-YEp352GAP-II 株を SD (-ウラシル) 液体培地 5ml で OD600=5 まで培養 (約 30 時間) し、培養液 1ml を回収し細胞を PBS [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na₂HPO₄、0.24mg / ml KH₂PO₄ (pH7.4)] で洗った。細胞を回収し、1 μ g の HA 抗体 [Anti-HA High Affinity (Roche)] を含む PBS 溶液 [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na₂HPO₄、0.24mg / ml KH₂PO₄ (pH7.4)、1mg / ml BSA] 250 μ l に懸濁し、30 分間氷上でインキュベートした。細胞を回収し PBS 溶液で一回洗った後、1 μ g の標識二次抗体 [Alexa FluorTM 546 goat anti-rat IgG (H+L) conjugate (Molecular Probe)] を含む PBS 溶液 [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na₂HPO₄、0.24mg / ml KH₂PO₄ (pH7.4)、1mg / ml BSA] 250 μ l に懸濁し、遮光して 30 分間氷上でインキュベートした。それぞれの 30 分間のインキュベーションの際に細胞と抗体溶液がよく混ざるようにときどき転倒法にて混ぜあわせた。細胞を回収し、PBS で 2 回洗った後、40 μ l の PBS に懸濁し細胞を蛍光顕微鏡にて観察した (図 2)。

その結果、W303-YEp352GAP-II (PIR1-HA-gma12) 株で Pir1-HA-Gma12 融合タンパク質が細胞表層で発現していることが確認された。

【 0 0 3 7 】

〔実施例 5〕 (ガラクトース転移酵素活性の測定)

ガラクトース転移酵素活性測定は、Yoko-o らの方法を参考に行った (Yoko-o, Eur. J. Biochem., 257, 630-637 (1998))。酵素源としては実施例 3 で作製した酵母細胞 [W303-YEp352GAP-II (PIR1-HA-gma12)] 自体を用いた。アクセプター基質として PA 化したマンノピオースを、またドナー基質として UDP-ガラクトースを用いた。反応液 [100mM HEPES (pH7.2)、1mM MnCl₂、5mM UDP-ガラクトース、300pmol PA 化マンノピオース] 50 μ l 中には細胞懸濁液 11 μ l が含まれるように調整し、37℃ で 5 時間インキュベーションした。細胞懸濁液は 0

D600=6の培養液を1ml分を回収し、洗浄バッファー [10mM Tris-HCl (pH8)、1mM PMSF] で2回洗った後、11 μ lの洗浄バッファー [10mM Tris-HCl (pH8)、1mM PMSF] に懸濁したものをを用いた。次いで、この反応液に30 μ lの氷冷した水を加えた後、沈殿した細胞を3000rpmで3分間遠心して取り除き、上清をウルトラフリー (0.22 μ m) で分子量10,000以上のものを取り除き、HPLCによりマンノピオースとガラクトシルマンノピオースを測定した。HPLCはAmide-80カラム (TSK gel Amide-80、東ソー、直径0.46cm×長さ25cm) を用いた。200 mM 酢酸ートリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの10:90の混合液 (A液)、200 mM 酢酸ートリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの60:40の混合液 (B液) を調製した。予め溶媒Aを流速1.0 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料注入直後から溶媒Bの割合を60分かけて100%まで直線的に上昇させ、PA化オリゴ糖を溶出した。

その結果、Pir1-HA-gma12の融合タンパク質を発現することができるW303-YEp352GAP-II (PIR1-HA-gma12) 株でのみ酵素産物のピークが検出され、ガラクトース転移酵素活性が確認できた (図3)。融合タンパク質を発現しない W303-YEp352GAP-II株ではガラクトース転移酵素活性は検出されなかった。

【0038】

【実施例6】 (PIR1-HA-FUT6融合遺伝子の作製及び融合遺伝子発現ベクターの作製、並びにこのプラスミドを含む酵母形質転換体の作製)

ヒトの α -1,3-FucTであるFUT6遺伝子 (DB名: GenBank; アクセッション: L01698) (Weston, J. Biol. Chem., 267, 24575-24585 (1992)) のアミノ酸コード領域を含むプラスミドpBS(SK-) / FT6H1.3 (創価大学の成松教授より供与) を鋳型に用い、プライマーはFUT6タンパク質のN-末端側にある膜貫通領域を除いて増幅できるように設計し、N-末端側にSalI、C-末端側にXhoI部位をあらかじめ含むようにした。以下の塩基配列を有するプライマーを用いた。

【0039】

フォワードプライマー:

5'-CCCGTCGACAATCCTATCTGCGTGTGTCTCAAGAC-3'

(配列番号8)

リバースプライマー：

5'-CCCCTCGAGTCAGGTGAACCAAGCCGCTATGCCGC-3'

(配列番号9)

ここでフォワードプライマーの塩基配列中の下線部はSalIを示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はXhoI部位を示す。PCRの際に用いた反応溶液の組成及び反応条件は実施例1の表2と実施例1の反応条件に従って行った。増幅された約1kbの断片をpBSII(PIR1-HA-gma12)のSalI-XhoI部位にインフレームになるように挿入してpBSII(PIR1-HA-FUT6)(pAB7)を構築した。このpBSII(PIR1-HA-FUT6)からPIR1-HA-FUT6部分をSacI-XhoIで切りだし、Blunting high (TOYOBO)で平滑化した後、発現用ベクターYEpl352GAP-II(当研究室の仲山より供与)のSmaI部位に挿入し、YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6)(pAB9)を構築した(図4)。

この発現ベクター YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6)は酵母W303-1A株(ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら、Glycobiology, Vol. 9, 133-141 (1999)]に形質転換し、W303- YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6)株を得た。

なお、W303- YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6)株は、平成12年11月16日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P- 18124として寄託されている。

【0040】

【実施例7】 (Pir1-HA-FUT6融合タンパク質の酵母細胞内での発現)

実施例6で得られた形質転換体について、細胞内で融合遺伝子が発現し、融合タンパク質が酵母細胞表層に提示されているかどうかを間接蛍光抗体法にて調べた。

まず、上記形質転換体W303- YEpl352GAP-II(PIR1-HA-FUT6)株とコントロールとしてYEpl352GAP-IIをW303-1A株に形質転換したW303-YEpl352GAP-II株をSD(ーウラシル)液体培地5mlでOD600=5まで培養(約30時間)し、培養液1mlを回収し、細胞をPBS [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na₂HPO₄、0.24mg / ml KH₂PO₄ (pH7.4)]で洗った。細胞を回収し、1μgのHA抗体 [Anti-HA High Affinity (Roche)]を含むPBS溶液 [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na₂HPO₄、0.24mg / ml KH₂PO₄ (pH7.4)、1mg / ml BSA] 250μlに懸濁し、3

0分間氷上でインキュベーションした。それぞれの細胞を回収しPBS溶液で一回洗った後、1 μ gの標識二次抗体 [Alexa Fluor™ 546 goat anti-rat IgG (H+L) conjugate (Molecular Probe)] を含むPBS溶液 [8mg / ml NaCl、0.2mg / ml KCl、1.44mg / ml Na₂HPO₄、0.24mg / ml KH₂PO₄ (pH7.4)、1mg / ml BSA] 250 μ lに懸濁し、遮光して30分間氷上でインキュベートした。それぞれの30分間のインキュベーションの際に細胞と抗体溶液がよく混ざるようにときどき転倒法にて混ぜあわせた。細胞を回収し、PBSで2回洗った後、40 μ lのPBSに懸濁し細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

その結果、W303- YEp352GAP-II (PIR1-HA-FUT6) 株でPir1-HA-FUT6融合タンパク質が表層で発現していることが確認された (図5)。

【 0 0 4 1 】

〔実施例8〕 (フコース転移酵素活性の測定)

フコース転移酵素活性測定は、グライコバイオロジー実験プロトコール (谷口ら監修, 156-159 (1996)) を参考に行った。酵素源としては実施例6で作製した酵母細胞 [W303-YEp352GAP-II (PIR1-HA-FUT6)] を洗浄バッファー中 [10mM Tris-HCl (pH8)、1mM PMSF] でガラスビーズにより破碎した細胞破碎液を用いた。アクセプター基質としてPA化したLacto-N-neotetraoseを、ドナー基質としてGDP-フコースを用いた。反応液 [50mM Cacodylate buffer (pH 6.8)、5mM ATP、25mM MnCl₂、0.075mM GDP-フコース、0.075mM PA化Lacto-N-neotetraose] 4.5 μ lに細胞破碎液5.5 μ lを加え、37℃で5時間インキュベーションした。細胞懸濁液はOD₆₀₀ = 6の培養液を0.25ml分回収し、洗浄バッファー [10mM Tris-HCl (pH 8)、1mM PMSF] で2回洗った後、ガラスビーズにて破碎した細胞破碎液を用いた。次いで、この反応を停止させるために98℃で3分間インキュベーションした後、反応液に40 μ lの氷冷した水を加えた。沈殿した細胞を3000rpmで3分間遠心して取り除いた後、上清をウルトラフリー (0.22 μ m) で分子量10,000以上のものを取り除いた。その後HPLCによりLacto-N-neotetraoseとLacto-N-fucopentaoseを測定した。HPLCはAmide-80カラム (TSK gel Amide-80、東ソー、直径0.46cm×長さ25cm) を用いた。200 mM酢酸トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの10 : 90の混合液 (A液)、200 mM酢酸トリエチルアミ

ン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの60 : 40の混合液 (B液) を調製した。
 予め溶媒Aを流速1.0 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料注入直後
 から溶媒Bの割合を60分かけて100%まで直線的に上昇させ、PA化オリゴ糖を溶出
 した。

その結果、Pir1-HA-FUT6の融合タンパク質を発現することができる、W303-YEp
 352GAP-II (PIR1-HA-FUT6) 株でのみ酵素産物のピークが検出されフコース、転移
 酵素活性が確認できた (図6)。融合タンパク質を発現しない W303-YEp352GAP-
 II株ではフコース転移酵素活性は検出されなかった。

【 0 0 4 2 】

【実施例9】 (PIR1-HA-KRE2融合遺伝子の作製及び融合遺伝子発現ベクターの
 作製)

出芽酵母のW303-1A (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら、Glycobio
 logy, Vol. 9, 133-141 (1999)] 株から得たゲノムを鋳型にしてPCR法によりKRE
 2遺伝子の単離を行った。

プライマーはデータベース上に登録されている塩基配列 (DB名 : GenBank ; ア
 クセション : X62647) に基づいて設計した。その際に、N-末端側にある膜貫通
 領域を除いて増幅できるように設計し、N-末端側にSalI、C-末端側にXhoI部位を
 あらかじめ含むようにした。以下の塩基配列を有するプライマーを用いた。

【 0 0 4 3 】

フォワードプライマー :

5'-GGGGGGTCGACAGCAATATATTCGAGTTCCATCTCCGC-3'

(配列番号10)

リバースプライマー :

5'-GGGGGCTCGAGCTACTCACGGAATTTTTTCCAGTTTTTGGC-3'

(配列番号11)

ここでフォワードプライマーの塩基配列中の下線部分はSalI部位を示し、リバ
 ースプライマーの塩基配列中の下線部分はXhoI部位を示す。このようにして設計
 したプライマーは常法により合成した。

PCRの際に用いた反応溶液の組成及び反応条件は実施例1の表1と実施例1の反応条件に従って行った。増幅された約1kbpの断片をpBSII(PIR1-HA-gma12)のSalI-XhoI部位にインフレームになるように挿入してpBSII(PIR1-HA-KRE2) (pAB27) を構築した。このpBSII(PIR1-HA-KRE2)からPIR1-HA-KRE2部分をSacI-XhoIで切りだし、Blunting high (TOYOBO) で平滑化した後、発現用ベクターYEp352GAP-I I (当研究室の仲山より供与) のSmaI部位に挿入し、YEp352GAP-II(PIR1-HA-KRE2) (pAB30) を構築した (図7)。

【 0 0 4 4 】

〔実施例10〕 (出芽酵母PIR2-FLAG融合遺伝子の構築)

出芽酵母のW303-1A (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら, Glycobiology, 9, 133-141 (1999)] 株から得たゲノムを鋳型にしてPCR法によりPIR2遺伝子を単離した。

プライマーはデータベース上に登録されている塩基配列 (DB名: GenBank; アクセス: D13741) に基づいて設計した。その際に、タンパク質をコードしている部分が制限酵素を用いて容易に切り出せるとともに、Pir2タンパク質のC-末端部分に標識抗原が付加できるように、N-末端部分にSacI部位、C-末端部分にFLAG標識抗原遺伝子にNotI部位をあらかじめ含んだプライマーを設計した。それぞれのプライマーの塩基配列を以下に示す。

【 0 0 4 5 】

フォワードプライマー:

5'-GGGGGGAGCTCATGCAATACAAAAAGACTTTGGTTGCC-3'

(配列番号12)

リバースプライマー:

5'-CCCCCGCGGCCGCTTGTCATCGTCATCCTTGTAAGTCACAGTCTATCAAATCG
ATAGCTTCCAAGTGG-3'

(配列番号13)

【 0 0 4 6 】

ここでフォワードプライマーの塩基配列中の下線部分はSacI部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はNotI部位を示す。またb x部分はFLAG

標識抗原遺伝子の配列を示す。このようにして設計したプライマーは常法により合成した。

PCRの際に用いた反応溶液の組成及び反応条件は実施例1の表1と実施例1の反応条件に従って行った。このPCRによって得られた約1kbpのDNA増幅断片をSacI-NotIで切りだし、pBluescript II SK(-) (stratagen 社) のSacI-NotI部位に挿入してpBSII(PIR2-FLAG) (pAB22) を構築した。

【 0 0 4 7 】

【実施例11】 (PIR2-FLAG-MNN1融合遺伝子の作製及び融合遺伝子発現ベクターの作製)

出芽酵母のW303-1A (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら, Glycobiology, 9, 133-141 (1999)] 株から得たゲノムを鋳型にしてPCR法によりMNN1遺伝子の単離を行った。

プライマーはデータベース上に登録されている塩基配列 (DB名: GenBank; アクセス: L23753) に基づいて設計した。その際に、N-末端側にある膜貫通領域を除いて増幅できるように設計し、N-末端側にNotI、C-末端側にSmaI部位をあらかじめ含むようにした。以下の塩基配列を有するプライマーを用いた。

【 0 0 4 8 】

フォワードプライマー:

5'-GGGGGGCGGCCGCAAAATGATGCGCTTATACGATCAAGCAATGTAAACAG-3'

(配列番号14)

リバースプライマー:

5'-GGGGGCCCCGGGCTAGCTTTGTTCGTGTCTAGAATTTTC-3'

(配列番号15)

【 0 0 4 9 】

ここでフォワードプライマーの塩基配列中の下線部分はNotI部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はSmaI部位を示す。このようにして設計したプライマーは常法により合成した。

PCRの際に用いた反応溶液の組成及び反応条件は実施例1の表1と実施例1の反応条件に従って行ったが伸長反応の時間を1分から2分に変えて行った。増幅さ

れた約2kbpの断片をpBSII (PIR2-FLAG) (pAB22)のNotI-SmaI部位にインフレームになるように挿入してpBSII (PIR2-FLAG-MNN1) (pAB28)を構築した。このpBSII (PIR2-FLAG-MNN1)からPIR2-FLAG-MNN1部分をSacI-SmaIで切りだし、発現用ベクターYE p352GAP-II (当研究室の仲山より供与)のSacI-SmaI部位に挿入し、YE p352GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1) (pAB29)を構築した。さらにロイシンマーカータを持ったプラスミドも構築するためYE p352GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1)からプロモーター領域、PIR2-FLAG-MNN1、ターミネーター領域を含むBglI断片を切り出し、自己増幅ベクターYE p351 [Hillら、YEAST, 2, 163-167 (1986)]のBglI部位に挿入し、YE p351GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1) (pAB31)を構築した (図8)。

【 0 0 5 0 】

【実施例12】 (発現ベクターYE p352GAP-II (PIR1-HA-KRE2)およびYE p351GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1)を含む酵母形質転換体の作製と両融合タンパク質の酵母細胞内での発現)

発現ベクター YE p352GAP-II (PIR1-HA-KRE2) およびYE p351GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1)は酵母W303-1A株 (ura3, leu2, his3, trp1, ade2) [Kainumaら、Glycobiology, 9, 133-141 (1999)]に同時に形質転換し、W303-YE p352GAP-II (PIR1-HA-KRE2), YE p351GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1)株を得た。W303-YE p352GAP-II (PIR1-HA-KRE2), YE p351GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1)株は、平成13年6月20日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、FERM P-18385として寄託されている。

得られた形質転換体について、細胞内で融合遺伝子が発現し、融合タンパク質が酵母細胞表層に提示されているかどうかをウェスタンブロッティング法にて調べた。PIRタンパク質はアルカリ感受性の結合様式にて細胞壁に共有結合していることから、PIRとの融合タンパク質も細胞壁画分を弱アルカリ処理することにより遊離されると予想される。

【 0 0 5 1 】

まず、上記形質転換体W303- YE p352GAP-II (PIR1-HA-KRE2), YE p351GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1)株とコントロールとしてYE p352GAP-IIをW303-1A株に形質転換したW303-YE p352GAP-II株をSD (-ウラシル、-ロイシン)、SD (-ウラシル)の液体

培地5mlでそれぞれOD600=5まで培養（約48時間）した後、細胞を回収し、Wash Buffer [10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM PMSF] で洗った。細胞の破碎は、細胞懸濁液にガラスビーズを加え、4℃で15分間ボルテックスをかけることにより行われた。破碎液は遠心後上清（図9A, Bのレーン1）とペレットに分けられた。ペレットはWash Buffer [10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM PMSF] で3回洗った後、100 μ lのLaemlli Buffer [4% SDS、20% glycerol、0.12M Tris-HCl (pH6.6)、8M urea、2% β -ME] に懸濁後、100℃で10分間ボイルした。このサンプルを遠心しさらに上清（図9A, Bのレーン2）とペレット画分にわけた。ペレット画分をNa-acetate Buffer (pH5.5) [0.1M Na-acetate] で3回洗い、100 μ lの弱アルカリ溶液で [30mM NaOH] 4℃、15時間インキュベーションした。弱アルカリ溶液との懸濁液を遠心し上清を回収した（図9A, Bのレーン3）。これらの回収したサンプルをSDS-PAGEした後、ウェスタンブロッティングを行った。その際、一次抗体はHA抗体 [MONOCLONAL ANTIBODY, HA.11 (CONVANCE)] およびFLAG抗体 [ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody (SIGMA)]、2次抗体は抗マウスIgG-HRP [Anti-Mouse IgG (H&L) HRP-Linked Antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY)] を用いた。HA抗体とFLAG抗体の2種の抗体で免疫染色するため、同じタンパク液をブロッティングしたメンブレンを2枚用意し、それぞれの抗体による免疫染色を行った。その結果、融合タンパク質が発現している株にのみ細胞壁画分を弱アルカリ処理した場合に特異的なバンドが検出された。このことからPir1-HA-Kre2融合タンパク質およびPir2-FLAG-Mnn1融合タンパク質はPIRの性質を示す細胞壁への結合様式で細胞壁に同時に局在していることが分かった。

【0052】

〔実施例13〕 （マンノースの連続的転移反応の測定）

マンノース転移酵素活性測定は、Lussierらの方法を参考に行った（Lussierら、JBC., 271, 11001-11008 (1996)）。酵素源としては実施例12で作製した酵母細胞 [W303- YEp352GAP-II (PIR1-HA-KRE2), YEp351GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1)] 自体を用いた。またコントロール株としてW303-YEp352GAP-II株を使用した。アクセプター基質としてPA化したマンノピオースを、またドナー基質としてGDP-マンノースを用いた。反応液 [100mM HEPES (pH7.2)、1mM MnCl₂、5mM GDP-

マンノース、300pmol PA化マンノピオース] 50 μ l中に細胞懸濁液20 μ lが含まれるように調整し、37℃で3時間インキュベーションした。細胞懸濁液はOD600=4の培養液を1ml分回収し、洗浄バッファー [10mM Tris-HCl (pH8)、1mM PMSF] で2回洗った後、20 μ lの洗浄バッファーに懸濁したものをを用いた。次いで、この反応液に50 μ lの氷冷した水を加えた後、沈殿した細胞を3000rpmで3分間遠心して取り除き、上清をウルトラフリー (0.22 μ m) で分子量10,000以上のものを取り除き、HPLCによりマンノピオース (2糖) とマンノトリオース (3糖) およびマンノテトラオース (4糖) を検出した。HPLCはAmide-80カラム (TSK gel Amide-80、東ソー、直径0.46cm×長さ25cm) を用いた。200 mM 酢酸トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの10:90の混合液 (A液)、200 mM 酢酸トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリルとの60:40の混合液 (B液) を調製した。予め溶媒Aを流速1.0 ml/minで流すことによりカラムを平衡化し、試料注入直後から溶媒Bの割合を60分かけて100%まで直線的に上昇させ、PA化オリゴ糖を溶出した。

【 0 0 5 3 】

その結果、Pir1-HA-Kre2とPir2-FLAG-Mnn1の両融合タンパク質を同時に発現することができるW303- YEp352GAP-II (PIR1-HA-KRE2) , YEp351GAP-II (PIR2-FLAG-MNN1)株でのみ、3糖 (マンノトリオース)、4糖 (マンノテトラオース) を示すピークを検出した (図10)。融合タンパク質を発現しない W303-YEp352GAP-II株では3糖 (マンノトリオース)、4糖 (マンノテトラオース) を示すピークは内在性の極微量の生成物を除きほぼ観察されなかった。 (図10)。

以上の結果からPIR1およびPIR2を細胞壁へのアンカータンパク質として有用タンパク質のN-末端側に連結すれば有用タンパク質を酵母細胞表層に提示させることが可能である。さらに上記のような融合タンパク質を同時に発現させれば、酵母細胞表層上で複雑な酵素の連続反応を容易におこさせることが可能であることが分かった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、参照によりその全体を本明細書に組み入れるものとする。

【 0 0 5 4 】

【発明の効果】

本発明によれば、糖転移酵素等の有用タンパク質をその酵素活性を損なうことなく酵母細胞表面に固定化し、これを固定化酵素として提供することができる。従って、酵素を精製する過程や酵素のビーズへの固定化の過程は省略できるので、極めて簡便にかつ大量に固定化酵素を製造することができる。

【 0 0 5 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Expression vector for fused gene and Method for producing immobilized enzyme

<130> 332-01094

<140>

<141>

<150> JP P2000-354396

<151> 2000-11-21

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

配列番号 1

<210> 1

<211> 341

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

Met Gln Tyr Lys Lys Ser Leu Val Ala Ser Ala Leu Val Ala Thr Ser

1 5 10 15

Leu Ala Ala Tyr Ala Pro Lys Asp Pro Trp Ser Thr Leu Thr Pro Ser

20 25 30

Ala Thr Tyr Lys Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Ser Ser Thr Phe Gly Ile

35 40 45

Ala Val Glu Pro Ile Ala Thr Thr Ala Ser Ser Lys Ala Lys Arg Ala

50 55 60

Ala Ala Ile Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Lys

65 70 75 80

Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala

85 90 95

Thr Thr Lys Thr Lys Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln

100 105 110

Ile Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ser Ala Lys Thr Thr Ala Ala Ala

115 120 125

Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Lys Thr Lys
130 135 140

Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln
165 170 175

Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Gln Ile Gln Ala Thr Thr Asn Thr Thr Val Ala Pro Val Ser Gln Ile
195 200 205

Thr Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Leu Thr Ser Ala Thr Ile Ile
210 215 220

Pro Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ile Thr Asn Gly Thr Asp Pro Val Thr
225 230 235 240

Ala Glu Thr Cys Lys Ser Ser Gly Thr Leu Glu Met Asn Leu Lys Gly
245 250 255

Gly Ile Leu Thr Asp Gly Lys Gly Arg Ile Gly Ser Ile Val Ala Asn
260 265 270

Arg Gln Phe Gln Phe Asp Gly Pro Pro Pro Gln Ala Gly Ala Ile Tyr
275 280 285

Ala Ala Gly Trp Ser Ile Thr Pro Glu Gly Asn Leu Ala Ile Gly Asp
290 295 300

Gln Asp Thr Phe Tyr Gln Cys Leu Ser Gly Asn Phe Tyr Asn Leu Tyr
305 310 315 320

Asp Glu His Ile Gly Thr Gln Cys Asn Ala Val His Leu Gln Ala Ile
325 330 335

Asp Leu Leu Asn Cys
340

配列番号 2

<210> 2

<211> 413

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

Met Gln Tyr Lys Lys Thr Leu Val Ala Ser Ala Leu Ala Ala Thr Thr
1 5 10 15

Leu Ala Ala Tyr Ala Pro Ser Glu Pro Trp Ser Thr Leu Thr Pro Thr
20 25 30

Ala Thr Tyr Ser Gly Gly Val Thr Asp Tyr Ala Ser Thr Phe Gly Ile
35 40 45

Ala Val Gln Pro Ile Ser Thr Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ala Thr
50 55 60

Thr Ala Ser Ser Lys Ala Lys Arg Ala Ala Ser Gln Ile Gly Asp Gly
65 70 75 80

Gln Val Gln Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ser Val Ser Thr Lys Ser Thr
85 90 95

Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr
100 105 110

Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Ile Gln
115 120 125

Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ser Ala Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser
130 135 140

Gln Ile Ser Asp Gly Gln Ile Gln Ala Thr Thr Thr Thr Leu Ala Pro
145 150 155 160

Lys Ser Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln
165 170 175

Ala Thr Thr Thr Thr Leu Ala Pro Lys Ser Thr Ala Ala Ala Val Ser
180 185 190

Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala
195 200 205

Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Lys Thr
210 215 220

Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr
225 230 235 240

Thr Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Gly Asp Gly Gln Val
245 250 255

Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Ala Ala Ala Val Ser Gln Ile Thr Asp
260 265 270

Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Gln Ala Ala Ser Gln Val
275 280 285

Ser Asp Gly Gln Val Gln Ala Thr Thr Ala Thr Ser Ala Ser Ala Ala
290 295 300

Ala Thr Ser Thr Asp Pro Val Asp Ala Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly
305 310 315 320

Thr Leu Glu Met Asn Leu Lys Gly Gly Ile Leu Thr Asp Gly Lys Gly
325 330 335

Arg Ile Gly Ser Ile Val Ala Asn Arg Gln Phe Gln Phe Asp Gly Pro
340 345 350

Pro Pro Gln Ala Gly Ala Ile Tyr Ala Ala Gly Trp Ser Ile Thr Pro

355

360

365

Asp Gly Asn Leu Ala Ile Gly Asp Asn Asp Val Phe Tyr Gln Cys Leu

370

375

380

Ser Gly Thr Phe Tyr Asn Leu Tyr Asp Glu His Ile Gly Ser Gln Cys

385

390

395

400

Thr Pro Val His Leu Glu Ala Ile Asp Leu Ile Asp Cys

405

410

配列番号 3

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ggggggagct catgcaatac aaaaaatcat tagttgcctc cgcc 44

配列番号 4

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

cccccgcggc cgcacagtgc aaatcgatag c

31

配列番号 5

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ggggggtcga cagcccgata ccaagcttca aacgaagatg

40

配列番号 6

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ggggctcgag ctaggatgat ggtttcaaaa gattttgaat atgatcc

47

配列番号 7

<210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ggggcccggg ctaggatgat ggtttcaaaa gattttgaat atgatcc

47

配列番号 8

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

cccgtcgaca atcctatctg cgtgtgtctc aagac

45

配列番号 9

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

cccctcgagt caggtgaacc aagccgctat gccgc

45

配列番号 1 0

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

gggggggtcga cagcaatata ttccgagttc catctccgc

39

配列番号 1 1

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

gggggctcga gctactcacg gaattttttc cagttttttg gc

42

配列番号 1 2

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

ggggggagct catgcaatac aaaaagactt tggttgcc

38

配列番号 1 3

<210> 13

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descripti n of Artificial Sequence:primer

<400> 13

ccccgcggc cgccttgtca tcgtatcct tgtagtcaca gtctatcaaa tcgatagctt 60
ccaagtgg 68

配列番号 1 4

<210> 14

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

ggggggcggc cgcaaatgat gcgcttatac gatcaagcaa tgtaaacag 49

配列番号 1 5

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

gggggcccgg gctagctttg ttcgtgtcta gaattttc

38

【図面の簡単な説明】

【図 1】 YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) (pAB4) の構造を示す。

【図 2】 形質転換体W303-YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) 株とコントロールのW303-YEp352GAP-II株について、融合タンパク質発現を蛍光抗体法にて検出した結果を示す。

【図 3】 形質転換体W303-YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12) 株とコントロールのW303-YEp352GAP-II株について、ガラクトース転移酵素活性を検出した結果を示す。図中の矢頭はガラクトシルマンノピオースのピークを示す。

【図 4】 YEp352GAP-II(PIR1-HA-FUT6) (pAB9) の構造を示す。

【図 5】 形質転換体W303-YEp352GAP-II(PIR1-HA-FUT6) 株とコントロールのW303-YEp352GAP-II株について、融合タンパク質発現を蛍光抗体法にて検出した結果を示す。

【図 6】 形質転換体W303-YEp352GAP-II(PIR1-HA-FUT6) 株とコントロールのW303-YEp352GAP-II株について、フコース転移酵素活性を検出した結果を示す。図中の矢頭はLacto-N-fucopentaoseのピークを示す。

【図 7】 YEp352GAP-II(PIR1-HA-KRE2)の構造を示す。

【図 8】 YEp352GAP-II(PIR2-FLAG-MNN1)の構造を示す。

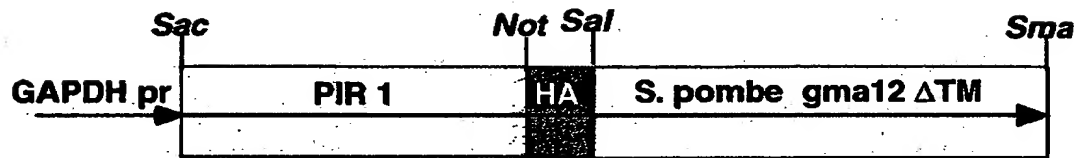
【図 9】 YEp352GAP-II(PIR1-HA-KRE2)およびYEp351GAP-II(PIR2-FLAG-MNN1)が酵母形質転換体において同時に発現していることを示す。

【図 10】 Pir1-HA-Kre2とPir2-FLAG-Mnn1とにより同時に形質転換された酵母[W303-YEp352GAP-II(PIR1-HA-KRE2), YEp351GAP-II(PIR2-FLAG-MNN1)]株が、上記両発現ベクターに起因するマンノースの連続転移反応を行うことを示す。

【選択図】 なし

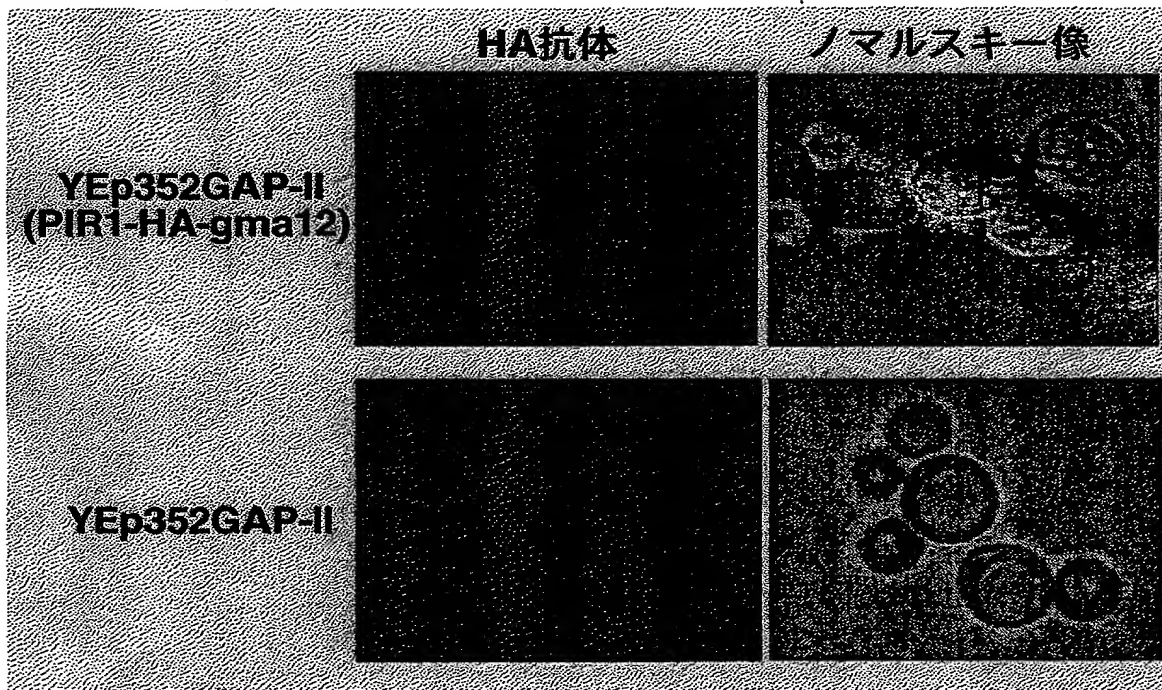
【書類名】 図面

【図 1】

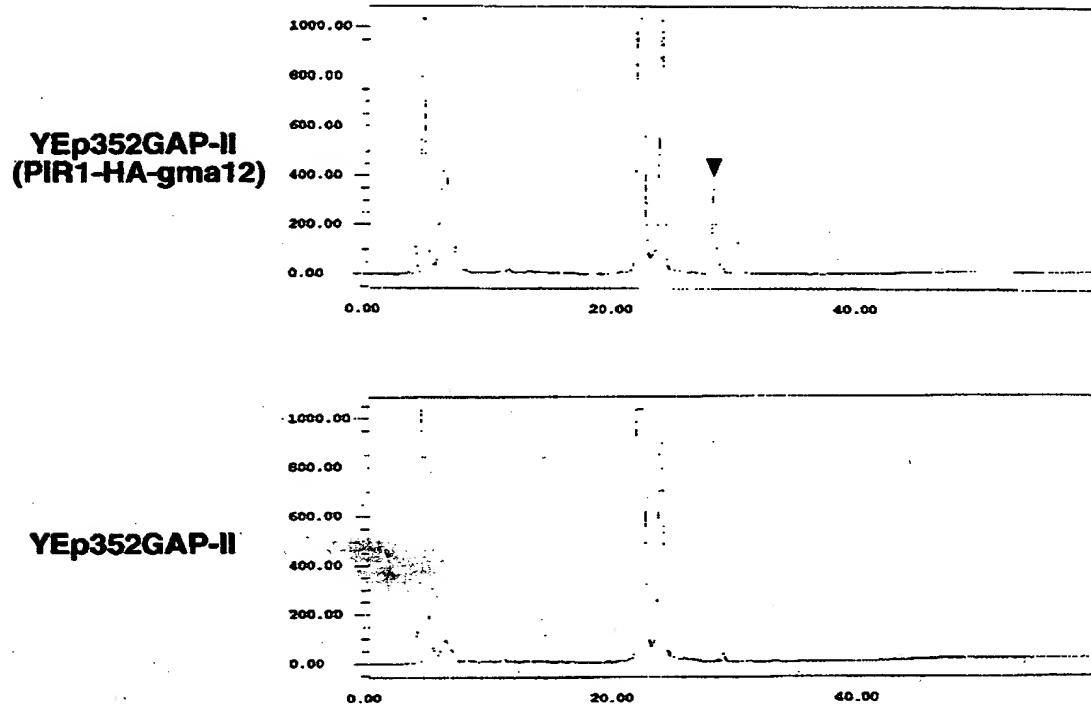


YEp352GAP-II(PIR1-HA-gma12)

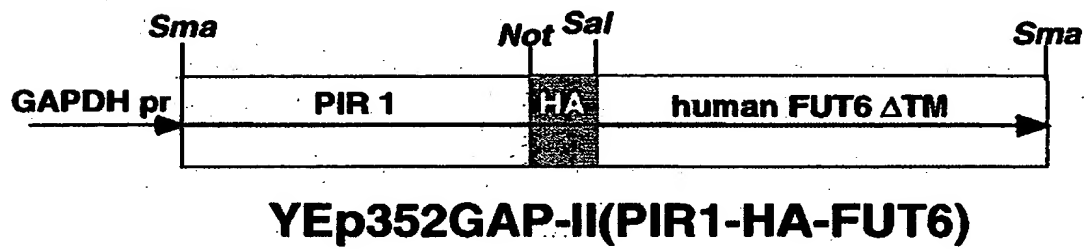
【図 2】



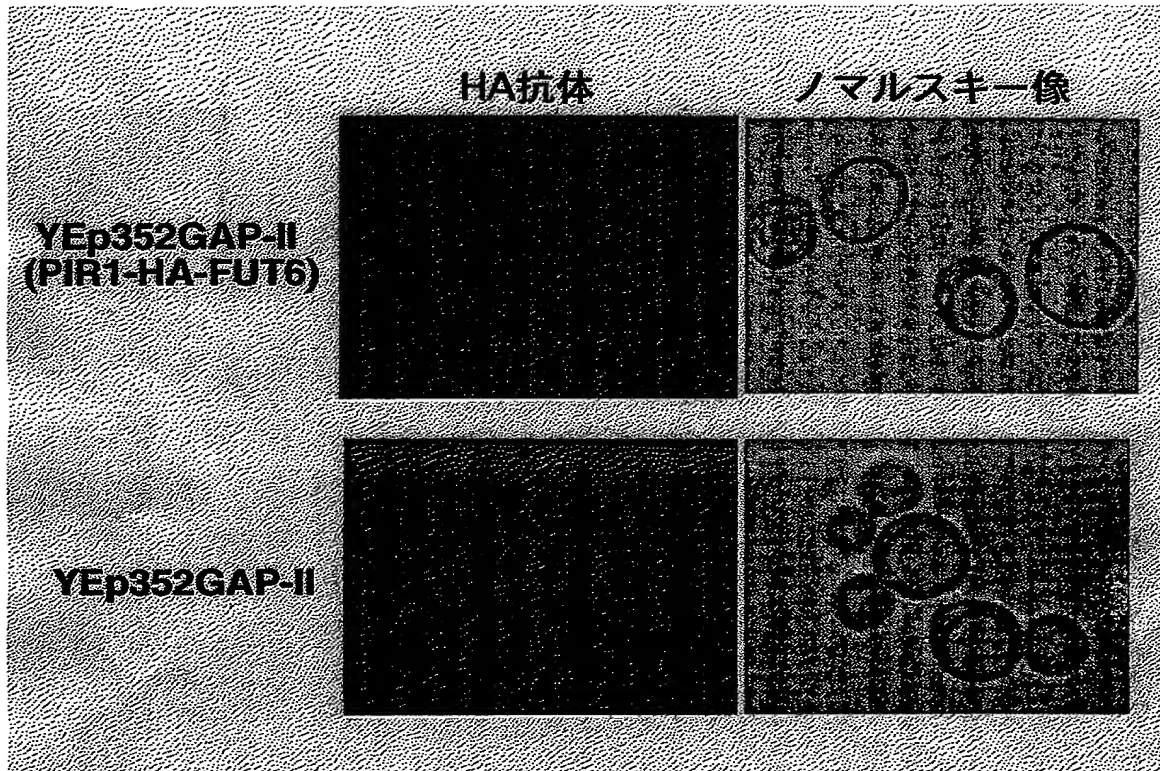
【図 3】



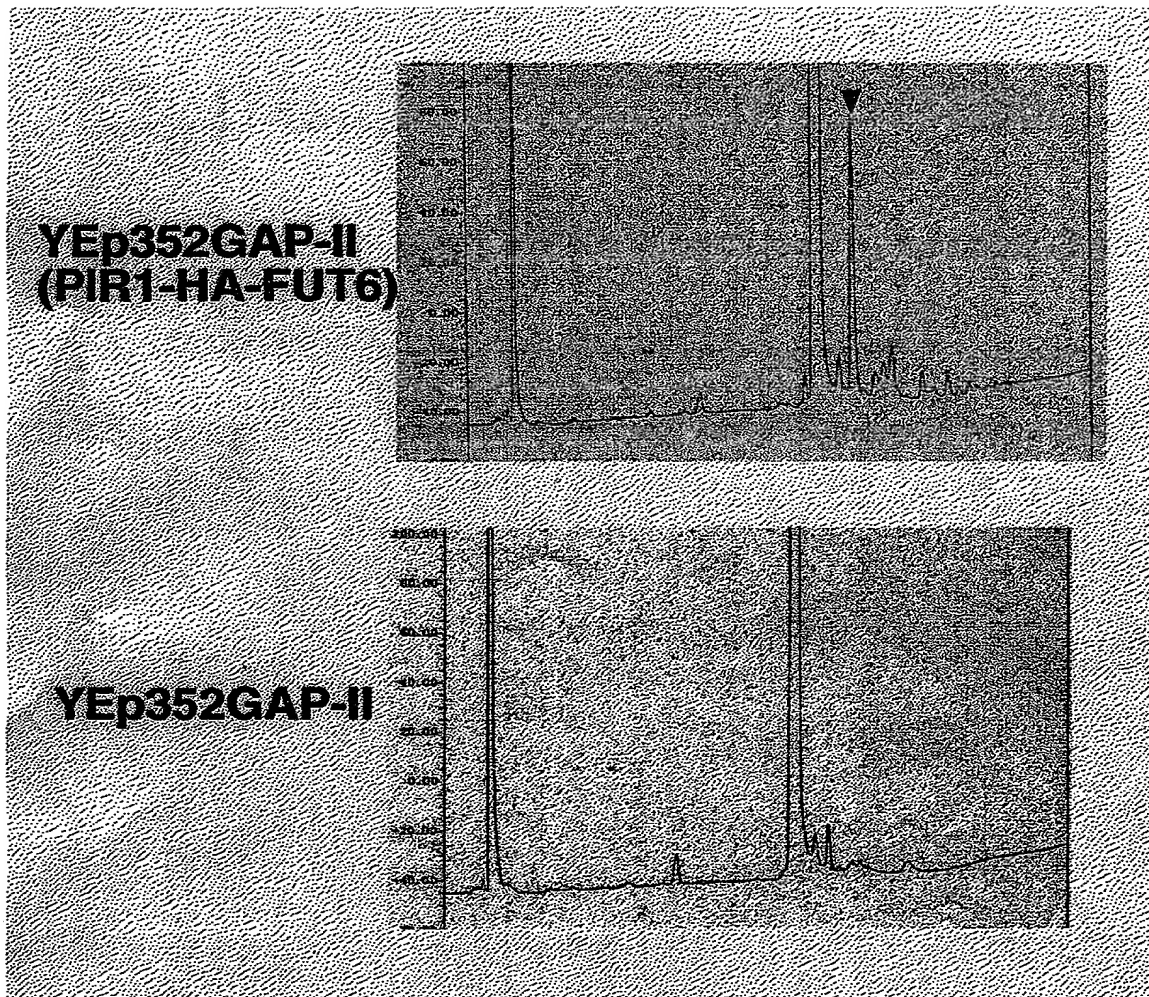
【図 4】



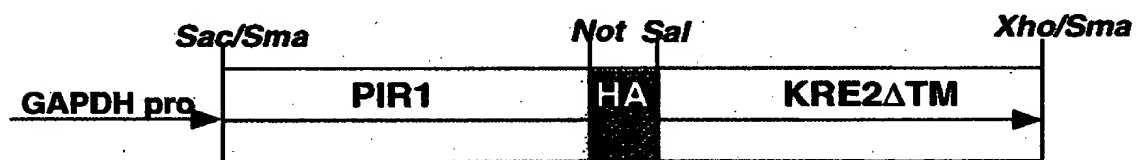
【図 5】



【図 6】

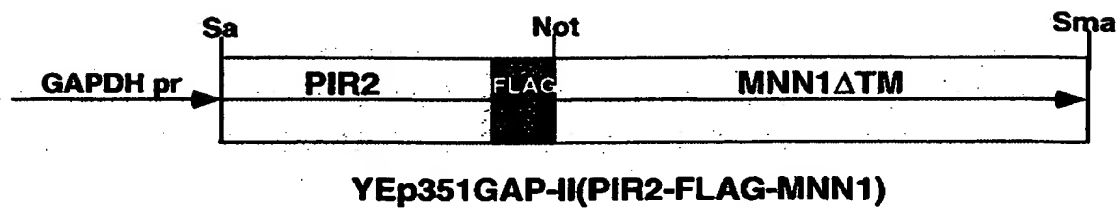


【図 7】

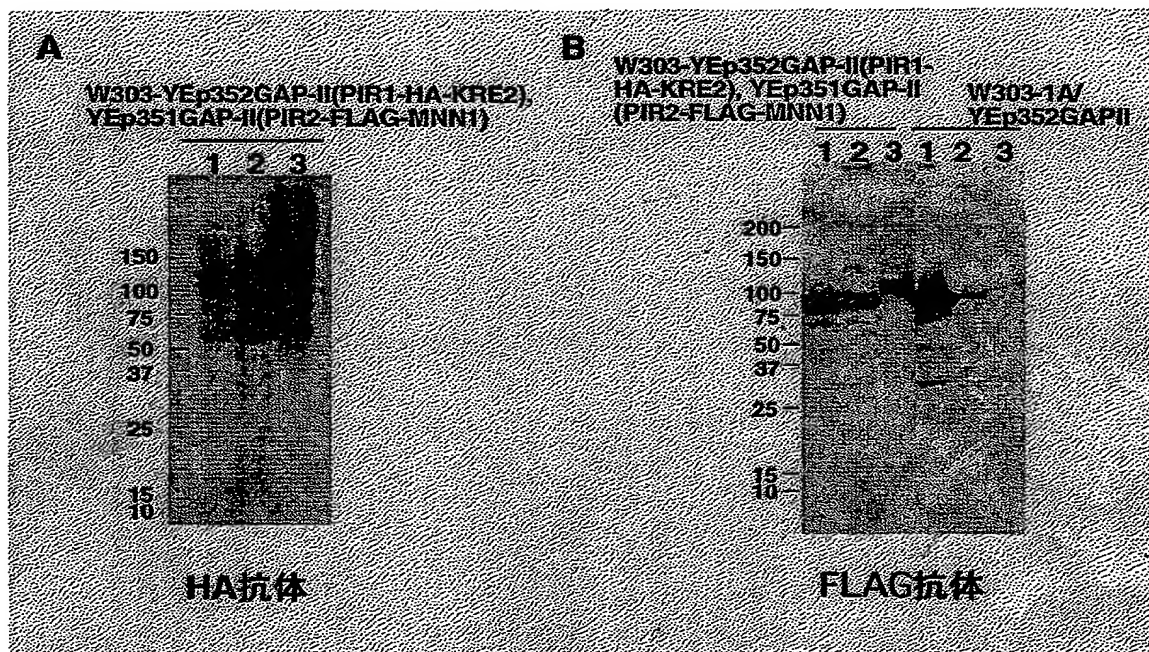


YEp352GAP-II(PIR1-HA-KRE2)

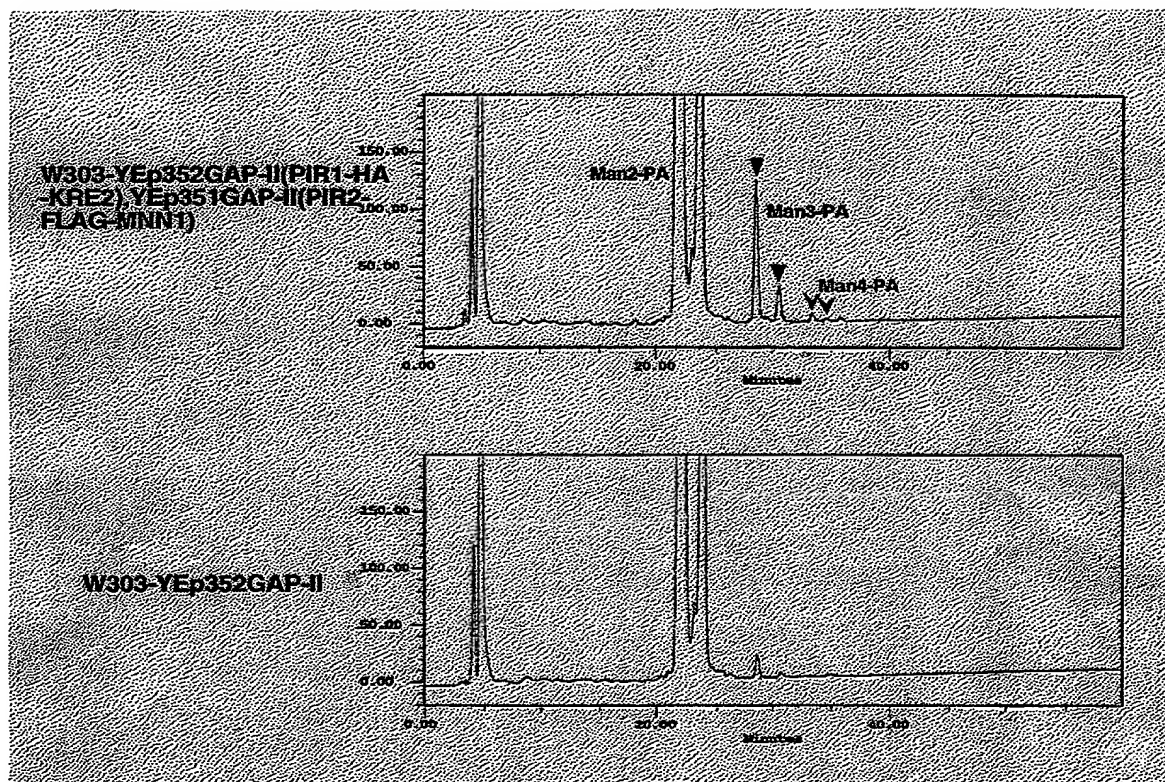
【図 8】



【図 9】



【図10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 糖転移酵素等の有用タンパク質をその酵素活性を損なうことなく酵母細胞表面に固定化する。

【解決手段】 酵母細胞壁タンパク質をコードする遺伝子の下流に、有用タンパク質をコードする遺伝子を結合させてなる融合遺伝子を含むことを特徴とする、融合遺伝子発現ベクター、該融合遺伝子発現ベクターにて形質転換された形質転換酵母、及び発現された有用タンパク質が酵母細胞壁に固定化されている固定化酵素。

特2001-190524

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-190524
受付番号	50100912538
書類名	特許願
担当官	角田 芳生 1918
作成日	平成13年10月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成13年 6月22日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所